

205
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“INHIBICION DEL PROCESO APOPTOTICO
EN CELULAS HeLa TRATADAS CON
CISPLATINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MIREYA VELAZQUEZ PANIAGUA



DE CIENCIAS
1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD DE CIEGO DE AVILA
FACULTAD DE CIENCIAS
Ciego de Avila, Ciego de Avila, Ciego de Avila

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Inhibición del proceso apoptótico en células HeLa tratadas
con Cisplatino".
realizado por Velázquez Paniagua Mireya.

con número de cuenta 9150703-1, pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

| | | |
|-------------------|-------------------------------------|--|
| Director de Tesis | Dr. Jorge Méndez Zajgla. | |
| Propietario | Dr. René de Jesús Cárdenas Vazquez. | |
| Propietario | Biol. Miguel Angel Meneses Perez. | |
| Suplente | Dra. Bertha Prieto Gómez. | |
| Suplente | M. en B. Benito Estrada Mena. | |

FACULTAD DE CIENCIAS
M. en B. Benito Estrada Mena.
Ciego de Avila, Ciego de Avila, Ciego de Avila
C. en B. Alejandro Martínez Mena.
COORDINADOR GENERAL
DE BIOTECNIA

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Básica del Instituto de
Cancerología, bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.**

"INHIBICION DEL PROCESO APOPTOTICO DE CELULAS HELA TRATADAS
CON CISPLATINO."

En recuerdo y memoria de mi Padre Filiberto Velázquez.

A mi Madre Eulalia Paniagua, por su gran comprensión y apoyo que siempre me ha brindado.

A mis hermanos con cariño y respeto.

A Jorge Meléndez y Vilma Maldonado, por su dedicación y esfuerzo para la realización de este trabajo.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencias y más allá de estas fronteras, principalmente a mi compañero que me apoyo moralmente durante este proceso.

A todos aquellos que de alguna u otra manera apoyaron la realización de este trabajo de tesis.

»

AGRADECIMIENTOS

A los sinodales: Dra. Bertha Prieto, Dr. René Cárdenas, M en IBB. Benito Mena y Biol. Miguel Angel Meneses por sus sugerencias y opiniones en la revisión del trabajo de tesis. Mil gracias.

Al Instituto Nacional de Cancerología en donde se realizó la labor practica y escrita de esta tesis.

A la Facultad de Ciencias. Principalmente a todos aquellos profesores que con su esfuerzo y dedicación hen sembrado una semilla más en esta Universidad.

A la Universidad Nacional Autonoma de México.

ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

AMPc: Monofosfato de Adenosina cíclico.

ARN: Acido ribonucleico.

ATP: Trifosfato de adenosina.

BSA: Suero bovino con albumina.

C: Citosina.

Cp: Cisplatino.

DMEM: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco.

EDTA: Acido etilendiaminotetracético.

G: Guanina.

G1,S,G2, y M: Fases del ciclo celular.

Kb: kilobases.

Kda: Kilodalton.

nm: nanometros.

nM: nanomolar.

M: molar.

mg: miligramos.

ml: millilitros.

mM: millimolar.

μM: micromolar

MTT. Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio.

pb: pares de bases.

PBS: Amortiguador Salino de Fosfatos.

LHRH: Corticotropina.

T: Timina

| | |
|---|----|
| INDICE. | |
| RESUMEN. | 1 |
| INTRODUCCION. | |
| GENERALIDADES. | 3 |
| -Características morfológicas de la apoptosis. | 3 |
| -Fragmentación del ADN en la apoptosis. | 4 |
| -Características distintivas de la apoptosis y la necrosis. | 6 |
| -Procesos fisiológicos y fisiopatológicos donde esta presente la apoptosis. | 8 |
| - Aspectos biomoleculares de la apoptosis. | 11 |
| -Cisplatino. | 12 |
| -Células HeLa. | 15 |
| -El papel del EDTA, EGTA y Zinc en la apoptosis. | 17 |
| -Inhibidores de macromoléculas. | 18 |
| JUSTIFICACION. | 21 |
| OBJETIVOS. | 22 |
| MATERIAL Y METODO | 23 |
| RESULTADOS. | 25 |
| DISCUSION. | 39 |
| CONCLUSIONES. | 44 |
| REFERENCIAS. | 45 |
| APENDICE. | 50 |

RESUMEN

La apoptosis es un proceso de muerte celular fisiológicamente activo, que a diferencia de la necrosis, depende de una serie de mecanismos genéticos, moleculares y bioquímicos que dirigen a la célula a la muerte.

En el presente trabajo se utilizó el modelo apoptótico de células HeLa (una estirpe derivada de un carcinoma humano de cervix uterino) tratadas con Cisplatino un antineoplásico.

En este estudio se trató de inhibir el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con Cisplatino, mediante diferentes agentes químicos, reportados previamente por varios autores, como capaces de bloquear la apoptosis en diversos modelos. Para este fin se utilizaron tres tipos de sustancias: Quelantes de iones divalentes (EDTA y EGTA) a una concentración de (1mM); Inhibidores de síntesis de macromoléculas (cicloheximida y actinomicina a diferentes concentraciones) y por último al Zinc un inhibidor de endonucleasas.

La obtención de los resultados comprendió un análisis de la viabilidad celular (mediante la técnica de MTT), análisis morfológico (mediante la técnica de bromuro de etidio) y un análisis bioquímico (electroforesis en geles de agarosa).

Los resultados experimentales mostraron que el modelo apoptótico de células HeLa, no se logró inhibir con los tratamientos de quelantes (EDTA y EGTA). Las células tratadas bajo estas condiciones presentaron características bioquímicas y morfológicas de apoptosis.

Los inhibidores de síntesis de macromoléculas (actinomicina y cicloheximida), tampoco lograron inhibir el proceso apoptótico inducido por cisplatino en HeLa. De la misma manera con estos inhibidores, se presentó un considerable descenso en la viabilidad celular. Estas células tratadas bajo las condiciones anteriormente mencionadas, mostraron características morfológicas típicas de apoptosis, corroborándose estos datos con los resultados de electroforesis obtenidos, donde se muestran los fragmentos de ADN de 180-

200 pb (patrón ladder). Además, por si mismos, estos inhibidores de macromoléculas pueden activar la muerte celular apoptótica en células HeLa.

El tratamiento con zinc logró inhibir el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino. Aunque el zinc no inhibe la muerte celular, bloquea al menos la muerte celular por vía apoptótica, ya que las células tratadas con zinc no presentaron ni cuerpos apoptóticos, ni el patrón "ladder".

Las características morfológicas observadas de las células HeLa tratadas con zinc muestran núcleos en forma arrionada. Esta característica no ha sido descrita en necrosis ni apoptosis.

Posiblemente el zinc este interfiriendo en vías fisiológicas importantes, que juegan un papel de reguladoras de la muerte por apoptosis.

INTRODUCCION.

1 - GENERALIDADES.

El término apoptosis fué introducido por Kerr en 1972, y se define como un proceso fisiológicamente activo de muerte celular que se presenta en tejidos normales durante la embriogénesis, diferenciación y metamorfosis (1).

Todos los organismos necesitan de los mecanismos apropiados para eliminar células anormales, así como aquellas que han cumplido con su función. La apoptosis es uno de estos mecanismos celulares, genéticamente programado para mantener el desarrollo normal y la homeostasis (4). Se reconoce que las células deben perderse continuamente en muchos tejidos normales para equilibrar la división celular, pues de lo contrario cuando este balance se altera el resultado final puede ser una expansión tumoral de células. El descubrimiento de una muerte celular programada, cuyas características ultraestructurales son consistentes con un fenómeno controlado y activo, apoya la hipótesis de que la muerte celular desempeña un papel importante en la regulación de la población celular en una variedad de tejidos, bajo condiciones fisiológicas y patológicas (5).

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LA APOPTOSIS.

La apoptosis afecta específicamente a células individuales o grupos pequeños de células de una manera asincrónica, siendo fácilmente identificadas mediante microscopio de luz. Los cambios morfológicos durante la apoptosis han sido extensamente estudiados, llegándose a demostrar que existe una secuencia de eventos que hacen de la apoptosis una forma de muerte celular con características morfológicas distintivas. Se ha observado que las células afectadas reducen su volumen, eliminan su contacto con las células vecinas, y pierden elementos de superficie especializados como microvellosidades y uniones intercelulares (49). La morfología de las células apoptóticas se caracteriza por una compactación y segregación de la cromatina en el núcleo, acompañada de una

condensación del citoplasma, preservando en buenas condiciones los organelos. Se desarrollan protuberancias pedunculares, que finalmente se separan de la célula, las cuales llegan a contener organelos intactos. A estas vesículas se les denomina cuerpos apoptóticos, siendo fagocitados y digeridos por células adyacentes in vivo (2). Es importante señalar que estos cuerpos no muestran evidencia estructural de degeneración y es probable que en esa etapa ellos sean capaces de presentar actividad metabólica (49).

LA FRAGMENTACION DEL ADN EN LA APOPTOSIS

Existe una considerable variación en la señal inicial y los eventos metabólicos celulares necesarios para inducir apoptosis, dependiendo en gran parte del tipo celular y de la naturaleza del evento externo, que dispara la apoptosis (5). En los descubrimientos de Wyllie, al estudiar el ADN de células apoptóticas, mediante electroforesis en geles de agarosa, se mostró que el ADN aparecía fragmentado como una escalera (ladder), conteniendo varias bandas de ADN, con fragmentos múltiples de 180-200 pb, aproximadamente(46). En su estudio Wyllie encontró que este patrón de ADN se debe a una activación de endonucleasas específicas (3). Si bien existen varias endonucleasas candidatas que rompen el ADN en este patrón "ladder", aún no han sido caracterizadas y purificadas, varios experimentos sugieren que incrementan su actividad, de una manera dependiente de los niveles de calcio citosólico, sosteniendo la idea de que la movilización de calcio es la clave para programar el rompimiento internucleosomal del ADN. Los trabajos de Mc Conkey, demostraron que timocitos inmaduros, al incrementar los niveles de calcio, activan la fragmentación del ADN (1). También en timocitos tratados con glucocorticoides (inductor de apoptosis en estas células) el aumento en los niveles de calcio citosólico estimula tanto la activación de la endonucleasa como la muerte celular. El pretratamiento intracelular con el ionóforo de calcio A23187 estimula la apoptosis en timocitos e incluso puede ser activada por la incubación del núcleo con concentraciones micromolares de calcio libre (7). La degradación del ADN ocurre en un patrón específico,

estas rupturas se encuentran cerca de la envoltura de la histona octámerica en el nucleosoma, lo cual indica que la cromatina ha sido cortada por la endonucleasa entre las uniones de los nucleosomas (región linker), produciéndose fragmentos oligonucleosómicos (11).

Desde el descubrimiento del rompimiento internucleosomal del ADN de timocitos tratados con glucocorticoides, este proceso ha sido observado en casi todos los casos de apoptosis que han sido estudiados, entre los que se incluyen al epitelio uterino, próstata, células eritroides, queratinocitos, linfocitos, células de leucemia, macrófagos. Adicionalmente la apoptosis inducida en timocitos por diversos estímulos (adenosina, AMPc, ionóforo de calcio, irradiación, hipertermia y ATP), se asocia con la fragmentación internucleosómica del ADN.

La fragmentación del ADN, ocurre muy tempranamente en el proceso apoptótico apareciendo varias horas antes de que la viabilidad de las células blanco decrezca (11).

El patrón de fragmentación del ADN durante la apoptosis es complejo, en realidad el ADN es degradado en pequeños fragmentos oligonucleosómicos que caracterizan el ladder. La fragmentación en la apoptosis está considerada en base a la organización estructural de la cromatina, la cual es cortada por una endonucleasa dependiente posiblemente de calcio y magnesio. Se ha propuesto un modelo de fragmentación del ADN en el cual participa la ADNasa 1, la cual se activa y rompe el ADN secuencialmente en 3 etapas. La primera etapa comienza con la activación de una endonucleasa la cual corta entre los bucles sobre las proteínas cromosómicas que forman el esqueleto cromosómico, en donde se anclan los bucles que son cortados aproximadamente a unas 300 kb (10). Se ha dicho que los sitios de corte son ricos en A:T. La segunda etapa, conforma al segundo nivel de corte, el cual esta dado dentro de los bucles, aquí los sitios de corte son ricos en G:C, y cada bucle cortado contiene entre 20 000 a 100 000 pb. La tercera etapa conforma cortes a nivel de los nucleosomas obteniendo fragmentos entre 180 a 200 pb dependiendo de la especie. A medida que la endonucleasa va cortando la cromatina está adquiriendo flexibilidad para llegar a cortar a nivel de nucleosoma. Estos tres niveles de corte de la endonucleasa pueden presentarse al mismo tiempo (10).

CARACTERISTICAS DISTINTIVAS DE APOPTOSIS Y NECROSIS.

La apariencia ultraestructural de la necrosis es del todo diferente a la que se presenta durante la apoptosis, siendo distintiva por la pérdida de permeabilidad selectiva de las membranas plasmáticas. Estas alteraciones son respuesta de la temprana desactivación de las bombas-ion de la membrana. Dado el movimiento de cationes a través de la membrana en altas concentraciones, le acompañan cambiantes fluidos, que causan el hinchamiento celular. El incremento de calcio citosólico libre, resulta en la activación de las fosforilasas membranales, que degradan los fosfolípidos, rompiendo así la membrana en general (11). Bioquímicamente la apoptosis difiere de la necrosis, por presentar el patrón ladder, que a diferencia de la necrosis el corrimiento del ADN aparece como una mancha desvanecida en un gel de agarosa (2). La muerte celular por necrosis ocurre en respuesta a la gran variedad de condiciones y sustancias tóxicas perjudiciales, incluyendo entre estas hipotermia, hipoxia, isquemia y trauma celular directo, entre otras. La tabla I resume, las características morfológicas que distingue a la apoptosis de la necrosis(2).

TABLA I. COMPARACION DE CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE NECROSIS Y APOPTOSIS.

| CARACTERISTICA | NECROSIS | APOPTOSIS |
|---|---|--|
| APARIENCIA HISTOLOGICA | Afecta usualmente grupos numerosos de células. Inflamación presente. | Afecta a células individuales. Inflamación ausente. |
| CAMBIOS ULTRA-ESTRUCTURALES DE LA CROMATINA | Poca marginación, desaparece cuando la membrana nuclear se destruye. | Marginación y condensación. |
| NUCLEOLO | Aparece compactado hasta la degradación citoplasmática. | Muestra granulos dispersos |
| MEMBRANA NUCLEAR | Presencia de estructuras porosas. | Progresiva convolución: resultando en protuberancias que terminan separándose. |
| CITOPLASMA | Hinchamiento de todos los compartimentos seguida por una ruptura de membranas y destrucción de organelos. | Condensación del citosol, estructuralmente todos los organelos están intactos. |

Tomado de Tomei D.L y Cope O.F. 1991. Harbor Laboratory Press. 5-21.

PROCESOS FISIOLÓGICOS Y FISIOPATOLÓGICOS EN DONDE ESTÁ PRESENTE LA APOPTOSIS.

La muerte celular en tejidos normales es un fenómeno biológico universal en el desarrollo de animales vertebrados e invertebrados. Un mejor término para la muerte de poblaciones celulares, durante el desarrollo del embrión, pudiera ser la pérdida celular programada, la cual es causada por la expresión de genes. El término apoptosis podría ser confinado a una forma específica de muerte celular que juega un papel importante en el desarrollo y regulación del crecimiento. (1). La apoptosis es importante en el desarrollo del embrión en vertebrados superiores, estando implicada en la pérdida de membranas interdigitales, en la fusión del paladar, en el desarrollo de la mucosa intestinal y de la retina. El recambio celular de tejidos normales adultos (células hepáticas, epitelio adrenal, epitelio cortical, criptas del epitelio intestinal y en la diferenciación de condrocitos), se da por apoptosis. Wyllie y Kerr sugieren que la apoptosis es un fenómeno activo normal, el cual juega una función regulatoria en el control del tamaño de la población celular (2, 60). Cuando el proceso apoptótico se encuentra alterado puede dar lugar a procesos fisiopatológicos en donde no se logra mantener la homeostasis de las poblaciones celulares, ya que el balance entre la proliferación y la apoptosis se pierde, como ocurre en el cáncer, SIDA, Alzheimer, etc. En las siguientes tablas (II y III) se presenta un panorama general de los tipos celulares donde la apoptosis se manifiesta, tanto en el desarrollo general, como en procesos fisiopatológicos (11).

Tabla II. SUCESOS Y MEDIADORES DE LA APOPTOSIS

| TIPO CELULAR (desarrollo general) | MEDIADOR |
|--|---|
| Blastocistos. Neuronas. | Poliaminas. Traslado de factores neurotróficos. Desarrollo. |
| C. elegans - Metamorfosis. Musculo intersegmental. Queratinocitos. | 20-hidroxiecdisona. Hormona tiroidea. |
| -Sistema inmune. Células T y B autoreactivas. Timocitos inmaduros. Células blanco. | Activación. Linfocitos T. Células citotóxicas K. |
| Células de la prostata. Seno lactante. Células cancerosas pancreáticas. Células del epitelio uterino. | Traslado de Andrógeno. Traslado de PRL. Análogos de LHRH. Traslado de hormonas Esteroides del ovario. |
| Células adrenocorticales. | Traslado de ACTA. |
| -General Células progenitoras eritroides. Timocitos. Hibridomas B. Monocitos. Células Endoteliales. | Factor de necrosis tumoral. Traslado eritropoyectin. Glucocorticoides. T-interleucina 6. T-interleucina d-b. Factor de crecimiento de fibroblastos. |
| Eosinófilos. | T- interleucina 5 y 3. |
| Células embrionarias. | T. de factores de crecimiento Epidermal. |
| Células granulosa y luteas. | PMGS. |
| Células neuronales. | T. del factor de crecimiento neural. |

Tomado de Schwartzman A.R. y Cidlowski A.J. 1993. Endocrine R;14: 133-151.

Tabla III. SUCESOS Y MEDIADORES DE LA APOPTOSIS.

| TIPO CELULAR (daño/enfermedad) | MEDIADOR |
|--|---|
| Células del músculo. Células renales. Células músculo neonatal. Glandúla parotida. | Atrofia del músculo Obstrucción ureteral. Bipuvacaina. Obstrucción ductal. |
| -Tejidos neoplásicos Leucemia aguda linfoblástica. Leucemia crónica mielogena. Leucemia linfocítica B. Tumor de la próstata. Cáncer pancreático. Carcinoma C. basal. Carcinoma C. escamosos. Tumor mamario. Cáncer del seno. Melanoma maligno. | Glucocorticoides. Glucocorticoides Glucocorticoides. Antagonista LHRH. Antagonista LHRH. Espontáneo Espontáneo. Espontáneo. Espontáneo. Espontáneo. |
| -Drogas Anticancerígenas Células ovaricas hamster C. | Cisplatino. Etoposido. Flourouracil-5. Methotrexato. Ara-c. |
| Leucemia C. mieloides | |
| -Condiciones adversas Fibroblastos (hamster). Mastocitoma murino. C. ovario (hamster). | Hipotermia. Hipertermia. Hipertermia. |
| -Lineas tumorales | |
| Intestino. Timocitos. Paratiroide. C. linfoides. Hígado. Macrófagos. Hepatocitos. Cerebelo inmaduro. Oligodendrocitos. Tejido linfoides. Células linfoides de la sangre periférica. | Irradiación. Irradiación. Irradiación. Colchicina. Dimetilnitrosamina. Gliotoxina. Acetaminofén. Metilmercurio. Linfotoxina. Ricin-abrin. Polimixina B. Infección por HIV. |

Tomado de Schwartzman A.R. y Cidlowski A.J. 1993. Endocrine R; 14: 133-151.

ASPECTOS BIOMOLECULARES DE APOPTOSIS.

La maquinaria básica de apoptosis está presente esencialmente en todas las células de organismos multicelulares, en todas las etapas de vida, pero la activación del programa de suicidio está regulado por muy diferentes señales originadas tanto del medio intracelular como extracelular. Estudios genéticos en el nematodo Caenorhabditis elegans y en el díptero Drosophila melanogaster, han sido dirigidos a la identificación de genes que son requeridos para la inducción del programa de muerte celular. Un mínimo de componentes del programa apoptótico ha sido conservado entre gusanos, insectos y vertebrados.

Varias señales diferentes son capaces de influenciar la decisión entre la vida y la muerte (daño celular dado por radiación, ionización, o infección viral, factores extracelulares, interacción celular y hormonas). Estas diversas señales pueden suprimir o promover la activación del programa de muerte (apoptosis). Sin embargo, ha sido difícil identificar a las moléculas responsables de apoptosis por sistemas convencionales bioquímicos y moleculares en los mamíferos. El programa de muerte celular en C. elegans puede estar dividido en 4 distintas etapas. Estas incluyen la decisión de una célula destinada a morir, la muerte de la célula, la absorción de la célula muerta por fagocitos y la degradación de los cuerpos fagocitados.

Tres genes afectan a todas las células somáticas en C. elegans : ced-3, ced-4 y ced-9, los dos primeros están directamente implicados en la inducción apoptótica, el tercero, ced-9, protege a las células inhibiendo la muerte por apoptosis. Este gen (ced-9) expresa una proteína que es homóloga a la familia de bcl-2 del humano, la cual logra inhibir la muerte celular en nématodos, consiguiendo parcialmente sustituir la pérdida de la función de ced-9 (6).

Varios sistemas de segundos mensajeros han sido asociados con la inducción de apoptosis. Los genes implicados en la muerte celular activa pueden influenciar en aspectos del desarrollo celular como en la apoptosis. Se ha demostrado que el gen supresor de tumores p53 y el proto-oncogen c-myc tienen efectos en la apoptosis de algunas células, además de participar en otros procesos celulares, como la proliferación. Cuando se expresa la proteína p53 en la línea celular leucémica mieloide M1, las células sufren apoptosis, sugiriendo que la proteína puede ser un regulador endógeno (11). Otro grupo de genes implicados en la apoptosis es la familia de bcl-2. Bcl-2 y bcl-xL inhiben la

apoptosis de diversos sistemas celulares y bax y bcl-xs suprimen la acción de bcl-2 induciendo apoptosis. La expresión de bcl-x fué detectada en varios tejidos, particularmente en el sistema nervioso central y en el timo (9). Se han identificado varias proteínas que pueden modular la apoptosis en varios tipos celulares. Una proteína específica cuya inducción y activación ha sido implicada en la apoptosis es una transglutaminasa. Esta proteína ocasiona una mezcla enlazante de proteínas, hasta producir una rigidez debajo de las membranas de los cuerpos apoptóticos ayudando así a prevenir la salida de su contenido, para después ser fagocitados por las células cercanas in vivo(2).

II.-CISPLATINO

QUIMICA:

El cis-diaminocloroplatino II (cisplatino) es un complejo inorgánico que contiene platino. Es un complejo metálico pesado que contiene un átomo central de platino rodeado por dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio en la posición cis, presenta la siguiente fórmula molecular: $PtCl_2H_6N_2$ su peso molecular es de 300.1: es soluble en agua o solución salina a 1 mg/ml.

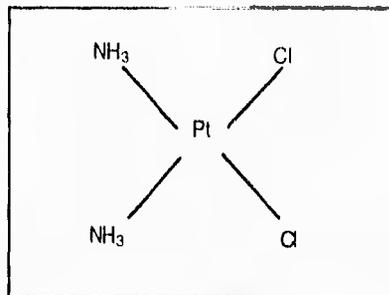


Fig1. Representación molecular del Cisplatino

ACCION:

El cisplatino posee propiedades bioquímicas similares a las de los agentes alquilantes bifuncionales que producen uniones cruzadas entre las cadenas de ADN (aductos). También se ha propuesto que el platino interactúa con metalotioninas o glutationinas, bloqueando de esta manera la formación de aductos en el ADN (51). Presenta una gran actividad electrofílica, que reacciona con cualquier nucleófilo, incluyendo grupos sulfrídilos en proteínas y grupos nucleófilos en ácidos nucleicos (18).

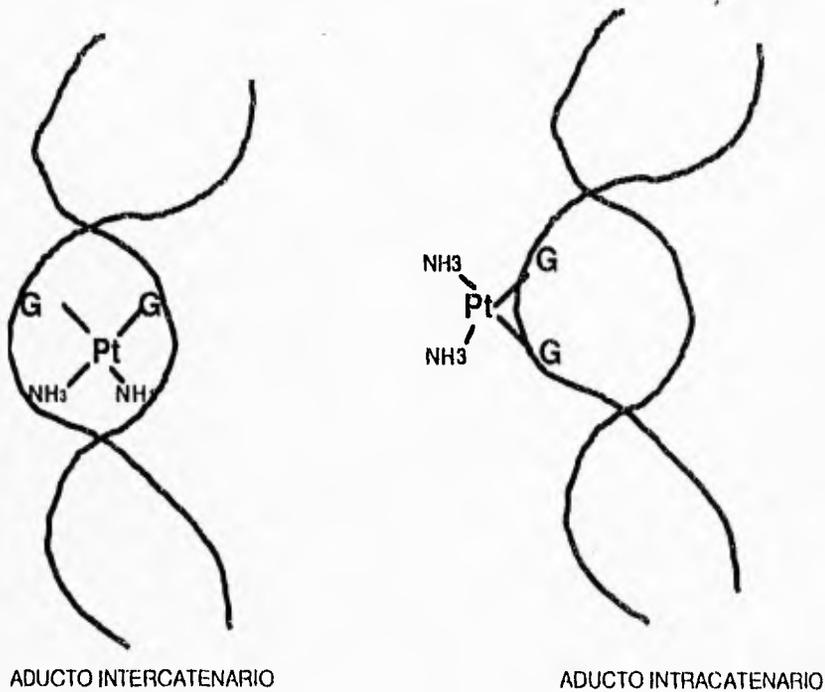


Fig2. Interaccion del cisplatino con el ADN.
Tomado de Fichtinger-Schepman et al. 1985. Biochemistry.

MECANISMO:

El cisplatino ingresa a las células por difusión, los átomos de cloro pueden ser desplazados directamente por reacción con nucleófilos como los tioles. La hidrólisis de cloruro probablemente sea responsable de la formación de especies activadas de la droga. Los complejos de platino pueden reaccionar con el ADN, formando uniones cruzadas intercadena e intracadena. El N(7) de la guanina es sumamente reactivo y las uniones cruzadas entre las guaninas adyacentes, sobre la misma cadena de ADN son fácilmente demostrables. Es probable que la geometría de la forma cis, más que la de forma trans sea más favorable para la formación de uniones cruzadas intercatenarias e intracatenarias. La formación de uniones cruzadas intercordonaes es un proceso relativamente lento y tiene lugar en mucho menor grado. La especificidad del cisplatino con respecto a la fase del ciclo celular parece diferir entre los distintos tipos celulares, aunque los efectos sobre las uniones cruzadas son más pronunciadas durante la fase S. Aún cuando el cisplatino es mutagénico, teratógeno y carcinogénico, no se ha registrado una incidencia aumentada de segundos tumores, observados con algunos de los agentes alquilantes. Además de su actividad con el ADN, el cisplatino puede reaccionar con otros nucleófilos tales como los grupos tioles de las proteínas (12).

El cisplatino tiene una potente actividad antitumoral. se usa en el tratamiento de enfermedades malignas, que incluyen cáncer testicular, de ovario, cuello, esófago y vejiga.

En particular, el cisplatino ha sido mostrado que induce apoptosis en células del ovario de hámster chino, aplicado en fase G2 del ciclo celular (52), en la línea celular leucémica L1210, en células cancerosas de ovario humano (50) y en células hepáticas de rata (20).

III.-CELULAS HELA

HeLa fue la primera línea celular epiteloidal y aneuploide derivada de un tejido humano y mantenida por cultivo celular seriado. Fue aislada por G. O. Gey, W.D. Coffman y M. T. Rubicek en febrero de 1951, proveniente del carcinoma de cervix de una mujer de 31 años. Tiene un alto grado de división celular, multiplicándose aproximadamente cada 24 horas el doble de la población existente (13).

CICLO CELULAR DE HELA

En células HeLa el ciclo de división se lleva a cabo aproximadamente cada 20 horas, duplicándose la población. La mitosis tiene una duración de 1.5 hrs, la fase G1 a partir de m2 tiene una duración de 8 hrs, la síntesis de ADN puede durar hasta más de 10 hrs (21).

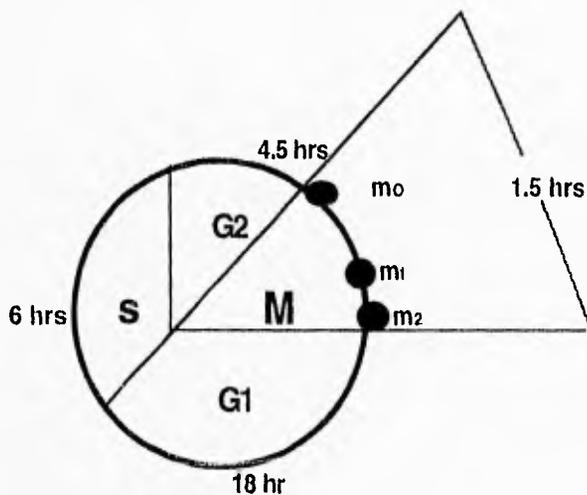


Fig 3. Ciclo celular de HeLa

CULTIVO CELULAR

Las células HeLa, han sido propagadas por años. El medio generalmente empleado consiste en una balanceada solución enriquecida con sales y suero extraído de tejidos embrionales. Para el crecimiento de esta línea celular se requiere de 13 aminoácidos esenciales (arginina, cisteína, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina y valina). La siguiente tabla (IV) resume los requerimientos para un crecimiento óptimo de células HeLa (15).

Tabla IV. REQUERIMIENTOS PARA EL CULTIVO CELULAR DE HELA.

| AMINOACIDOS (mM) | VITAMINAS (mM) |
|------------------------|---|
| Triptofano 0.01 | Colina 0.01 |
| Histidina 0.02 | Acido fólico 0.01 |
| Cisteína 0.03 | Nicotinamida 0.01 |
| Tirosina 0.03 | Pantotenato 0.01 |
| Metionina 0.03 | Piridoxal 0.01 |
| Fenilalanina 0.05 | Riboflavina 0.01 |
| Arginina 0.05 | Tiamina 0.001 |
| Leucina 0.1 | |
| Treonina 0.1 | |
| Valina 0.1 | |
| Lisina 0.1 | |
| Isoleucina 0.1 | |
| Glutamina 1.0 | |
| | SALES (mM) |
| | NaCl 100 |
| | KCl 5 |
| | NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 1 |
| | NaHCO ₃ 20 |
| | CaCl ₂ 1 |
| | MgCl ₂ 0.5 |
| COMPONENTES EXTRA | |
| Glucosa 5 mM | |
| Penicilina 0.005 % | |
| Estreptomicina 0.005 % | |
| Rojo fenol 0.0005 % | |
| Suero fetal B 5 % | |

Tomado de Eagle H. 1955. Science; 122: 17-20.

EL PAPEL DEL EDTA, EGTA Y ZINC EN LA APOPTOSIS.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un quelante eficaz de muchos metales divalentes y trivalentes y el EGTA es un quelante específico de calcio y magnesio (16). Estos quelantes han sido utilizados en varios tipos celulares que experimentan apoptosis, en los cuales parece jugar un papel importante el calcio, para la activación de una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio, que corta el ADN en un patrón específico. Se ha demostrado que la apoptosis en timocitos puede ser inhibida por quelantes de calcio como EGTA y EDTA (25). En células del bazo humano que experimentan fragmentación del ADN y por consecuencia apoptosis, el proceso se ha logrado inhibir con EGTA 2 mM (26).

En células leucémicas linfocíticas la fragmentación del ADN inducida por "fragmentin" ha sido inhibida por EGTA, esto también se ha visto en células linfoblastoides que sufren apoptosis inducida por oxidación, el proceso de fragmentación, se ha inhibido por el EGTA, demostrándose que el proceso es dependiente de calcio (27, 28).

Por otra parte McConkey y Duken (56) demostraron que esta endonucleasa, que se presume ser la responsable de las rupturas internucleosómicas, se activa con calcio y magnesio, y es inhibida por zinc. La influencia inhibitoria del zinc sobre la endonucleasa propuesta por Gaido y Cidowski, es que el zinc podría estar ocupando un supuesto sitio de unión en la endonucleasa provocándole su inactividad, Koizumi y Walkes (57) reportan las interacciones entre zinc y los grupos fosfatos del ADN, estabilizando la estructura macromolecular contra la endonucleasa. La modificación de la estructura de la cromatina por poliaminas puede prevenir la fragmentación de ADN y la apoptosis en timocitos. Esto sugiere que la ruptura internucleosomal mediada por la endonucleasa ocurre solamente cuando las regiones son accesibles (58). Experimentos en núcleos de células de hígado de bovino han demostrado que la inhibición por el zinc depende de las concentraciones de calcio libre. Altas concentraciones de calcio causan una baja en la inhibición por zinc. Este hecho sugiere una reacción competitiva entre el calcio y el zinc en algún sitio intracelular, proponiéndose que el balance entre calcio/zinc es responsable de

la regulación de la endonucleasa (7). En células HeLa tratadas con VP-16, el zinc (1-5 mM) previene la fragmentación de ADN (8)

INHIBIDORES DE MACROMOLECULAS.

La apoptosis resulta de una decisión celular, basada en la información y medio ambiente de la célula. En timocitos la apoptosis es inhibida por bloqueadores de la síntesis de proteínas y de ARNm, sugiriendo que la apoptosis es un proceso activo y por lo tanto requiere de síntesis de macromoléculas específicas para poder llevarse a cabo (9). Así en varios sistemas experimentales se ha usado la cicloheximida y actinomicina para inhibir el proceso apoptótico.

CICLOHEXIMIDA.

La cicloheximida inhibe la actividad de peptidiltransferasa de la subunidad ribosomal 50 S en células eucariotas, interaccionando directamente con la enzima translocasa que participa en la reacción de translocación, así inhibiendo la síntesis de proteínas.

ACTINOMICINA.

La actinomicina es un antibiótico (anticanceroso), que consiste en un cromóforo aromático de 3 anillos (actinocina) y 2 bucles peptídicos. La capacidad de las actinomicinas para reaccionar con el ADN parece ser el principal factor para su citotoxicidad. Esta inhibe la síntesis de ARNm dependiendo del ADN, particularmente la síntesis de ARN ribosómico en los nucléolos de las células cancerosas. Los bucles peptídicos actúan como anclas para sostener el esqueleto de actinomicina en un par de bases purina-pirimidina, impidiendo la transcripción del ADN, al formar complejos con el ADN, combinándose con los residuos de desoxiguanosina. De esta manera se inhibe a la ARN polimerasa, bloqueando la formación de la síntesis (17). La actinomicina D bloquea la transcripción de

todos los ARN. A bajas dosis (40 ng/ml) causa una inhibición preferencial de la síntesis de ARNr. En células Hela tratadas con actinomicina se ha mostrado que existe una dependencia de las concentraciones de actinomicina D, demostrándose que a altas concentraciones (1.0 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 h) induce severa inhibición irreversible del crecimiento celular, mientras a bajas dosis (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 h), causa una inhibición reversible del crecimiento celular (19).

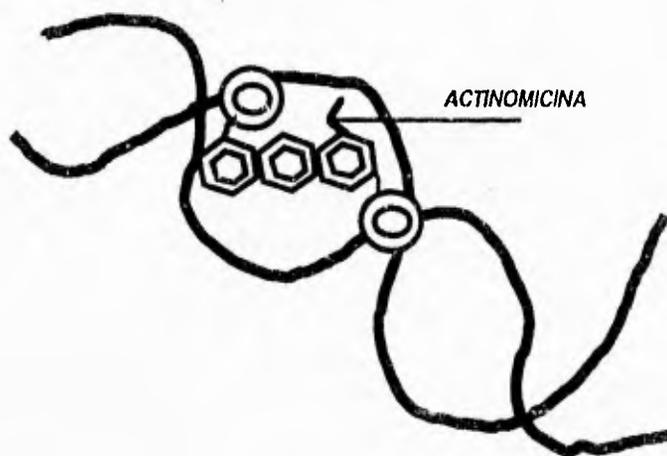


Fig.4. Representación esquemática de la Interacción de actinomicina D en el ADN
Tomado de Meyers et al. 1978. Farmacología Clínica. Manual Moderno.

Se ha mostrado en varios tipos celulares que experimentan apoptosis por diferentes vías, una inhibición del proceso apoptótico, por inhibidores macromoleculares como actinomicina y la cicloheximida. Timocitos humanos tratados con adenosina experimentan

apoptosis, la cual es inhibida por actinomicina D (10 $\mu\text{g/ml}$) y por cicloheximida (50 $\mu\text{g/ml}$), siendo requerida así la transcripción y síntesis de proteína para la inducción de la muerte celular apoptótica (22). En timocitos de rata, tratados con ionóforo de calcio, se ha mostrado la inhibición del proceso apoptótico con cicloheximida (1 $\mu\text{g/ml}$) hasta en un 94 % de inhibición de la fragmentación del ADN (24). La inducción de la muerte celular apoptótica en la diferenciación de células neuroblastomas SH-SY5Y por colchicina, puede ser inhibida por cicloheximida (0.1 μM), (23). En linfocitos estos inhibidores macromoleculares han demostrado que inhiben el proceso apoptótico implicando así que el proceso de apoptosis depende de la síntesis de ARNm y proteínas en estos tipos celulares (29).

Justificación:

Se ha encontrado que las células HeLa, tratadas con el antineoplásico cisplatino presentan características morfológicas y bioquímicas propias de la apoptosis. Siendo HeLa un buen modelo de estudio para caracterizar este proceso y proveer información acerca de las posibles vías involucradas en el mismo, se procedió a tratar de inhibirlo mediante diferentes agentes químicos, reportados previamente por varios autores como capaces de bloquear la apoptosis en diversos modelos. Dado que la génesis, mediación y conclusión de la apoptosis continúa sin esclarecerse, esta información sería valiosa para enfocar de manera directa futuras investigaciones, con el fin de determinar los mecanismos de la muerte celular apoptótica en células eucariotas tratadas con agentes que dañan el ADN.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar el proceso de apoptosis en células HeLa inducido por cisplatino determinando los efectos de inhibidores de síntesis de macromoléculas, quelantes de iones divalentes e inhibidores de nucleasas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

-Determinar el efecto de los quelantes en el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino con los quelantes de iones EDTA(0.1mM), EGTA (0.1mM), para deducir el papel de iones como el calcio y magnesio en este proceso.

-Determinar el efecto de inhibidores de síntesis de macromoléculas(actinomicina D (0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y cicloheximida (0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) sobre el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino.

-Determinar el efecto del Zn (0.25 0.5, 1.0 mM) un inhibidor de la endonucleasa supuesta en algunos sistemas, sobre el proceso apoptótico en células HeLa tratadas con cisplatino.

MATERIAL Y METODO.

Las células HeLa se crecieron en monocapa en medio de cultivo DMEM con 10 % (v/v) de suero fetal bovino. Se mantuvieron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5 % (v/v) de CO₂

DISEÑO EXPERIMENTAL.**-Viabilidad celular.**

Se sembraron células HeLa al 50 % de confluencia en cajas de 96 pozos, mantenidas en las condiciones anteriormente descritas.

La viabilidad se midió aproximadamente cada 24 hrs durante 3 días. Con el ensayo de MTT, como se describe en Denizot et .,al (53). Brevemente, se agregó a cada pozo de células con 100 microlitros de solución de MTT (5mg/ml). Se incubo 4 horas y se disolvió con isopropanol con 0.4 N de HCl. Se midió la absorbancia a 570 nm, con substracción a 650 nm. Cada experimento se realizó por triplicado.

| TRATAMIENTOS | | |
|--|-------------------------------------|--|
| QUELANTES | EDTA 1mM | EDTA 1mM + CP(40µM) |
| | EGTA 1mM | EGTA 1mM + CP(40µM) |
| INHIBIDORES DE SINTESIS DE MACRO-MOLECULAS | CICLOHEXIMIDA (0.1,1.0,10 µg/ml) | CICLOHEXIMIDA + CP(40µM) (0.1,1.0,10 µg/ml) |
| | ACTINOMICINA (0.1,0.5,1.0 µg/ml) | ACTINOMICINA + CP(40µM) (0.1,0.5,1.0 µg/ml) |
| | ZINC (0.25, 0.5, 1 mM) | ZINC + CP(40µM) (0.25, 0.5, 1 mM) |

CP-Cisplalino.

MORFOLOGIA.

Se sembraron sobre cubreobjetos en cajas multipozos, un millón de células HeLa por pozo, las cuales fueron mantenidas en las condiciones previamente descritas. Una serie comprendía Control, EDTA (1mM), EGTA (1mM), ZnSO₄ (1mM), cicloheximida (1.0 µg/ml), actinomicina (0.1 µg/ml) y otra serie contenía a todos los lotes anteriores más cisplatino a las mismas concentraciones mencionadas. A las 18 hrs fueron retirados los tratamientos de todas las muestras y se fijaron con etanol al 70 % a -20 grados durante 10 minutos, se hicieron lavados 1ml por muestra de PBS (1x) por 5 minutos, al tercer lavado se le agregó 5 microlitros de RNAasa (10 µg/ml) incubándose por 2 hrs a 37 grados, se le añadió 2 microlitros de bromuro de etidio (10 mg/ml) por 15 minutos, se lavaron con PBS por 5 minutos. Se montó la preparación con resina hidrosoluble y se observó en microscopio de fluorescencia con objetivo de 40 X tomándose la foto de cada muestra.

EXTRACCION DE FRAGMENTOS CORTOS DE ADN.

Se sembraron cajas con 3 millones de células HeLa incubándose con los tratamientos anteriormente descritos. A las 18 hrs se les agregó 0.5 ml de la solución de lisis (Tris 10 mM pH= 7.5, EDTA 10 mM, Tritón 0.2 %) por muestra, se lisaron por 3 ciclos de congelación-descongelación, se incubaron con 5 µl de RNAasa (10 mg/ml) a 55 ° C por 30 minutos, en seguida se incubaron con 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) a 55 ° C por 60 minutos. Para precipitar el ADN de alto peso molecular se agregó 0.4 volúmenes de NaCl (5 M) más 2 volúmenes de etanol al 100 %. Se retiró el ADN de alto peso molecular con una pipeta pasteur. Las muestras se incubaron a -70 por 24 hrs. Se centrifugaron las muestras a 11 500 rpm. El botón de ADN fue secado por vacío, y se corrió en geles de agarosa (0.8 % de agarosa, 2 µl de bromuro de etidio, 100 ml de TBE 0.5 X). La fragmentación de ADN fue observada en un transiluminador de rayos ultravioleta a 340 nm y fotografiada.

RESULTADOS DE LA VIABILIDAD CELULAR. Medias obtenidas mediante la técnica de MTT, en células HeLa tratadas con (EDTA, EGTA, Actinomicina, Cicloheximida y zinc) más cisplatino con sus respectivos porcentajes y desviación standard (* D.S.).

-EDTA-EGTA.

| x TRATAMIENTOS | | | | | | |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| TIEMPO hrs | CONTROL | EDTA | EGTA | CP | CP-EDTA | CP-EGTA |
| 0 | 0.1440 *0.009 | 0.1440 *0.009 | 0.1440 *0.009 | 0.1440 *0.009 | 0.1440 *0.009 | 0.1440 *0.009 |
| 24 | 0.4150 *0.040 | 0.3798 *0.012 | 0.4710 *0.031 | 0.2383 *0.015 | 0.1637 *0.009 | 0.1851 *0.014 |
| 48 | 0.6160 *0.026 | 0.5261 *0.041 | 0.6741 *0.037 | 0.1943 *0.048 | 0.1474 *0.003 | 0.1821 *0.022 |

| % TRATAMIENTOS | | | | | | |
|----------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| TIEMPO hrs | CONTROL | EDTA | EGTA | CP | CP-EDTA | CP-EGTA |
| 0 | 100 *6 | 100 *6 | 100 *6 | 100 *6 | 100 *6 | 100 *6 |
| 24 | 100 *9 | 91 *7 | 96 *3 | 56 *3 | 39.4 *3 | 39.7 *2 |
| 48 | 100 *23 | 77.6 *8 | 99.4 *9 | 28.6 *10 | 21.7 *5 | 26.8 *7 |

-ACTINOMICINA

| x TRATAMIENTOS | | | | | | | | |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| TIEMPO hr | CTRL | ACT.1 | ACT.5 | ACT-1 | CP | CP-ACT-1 | CP-ACT-5 | CP-ACT-1 |
| 0 | 0.2130 *0.005 |
| 17 | 0.2983 *0.043 | 0.2171 *0.004 | 0.1461 *0.007 | 0.1361 *0.014 | 0.1974 *0.019 | 0.1460 *0.002 | 0.0993 *0.017 | 0.0948 *0.003 |
| 40 | 0.3993 *0.010 | 0.1374 *0.011 | 0.0966 *0.001 | 0.0975 *0.002 | 0.1248 *0.017 | 0.0859 *0.005 | 0.0850 *0.003 | 0.0881 *0.010 |

| % TRATAMIENTOS | | | | | | | | |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| TIEMPO hrs | CTRL | ACT-.1 | ACT.5 | ACT 1 | CP | CP-ACT.1 | CP-ACT-.5 | CP-ACT-1 |
| 0 | 100 '2.3 |
| 17 | 100 '14 | 73 '1.3 | 49 '2.3 | 45 '4.7 | 66 '6.3 | 49 '3 | 33 '5.6 | 32 '1 |
| 40 | 100 '2.5 | 34 '2.7 | 24 '0.5 | 24 '0.5 | 31 '4.2 | 21 '1.2 | 21 '0.7 | 22 '2.5 |

-CICLOHEXIMIDA

| x TRATAMIENTOS | | | | | | | | |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| TIEMPO hrs | CTRL | CHX.1 | CHX1 | CHX 10 | CP | CP-CHX. | CP-CHX 1 | CP-CHX 10 |
| 0 | 0.4155 '0.013 |
| 17 | 0.5588 '0.007 | 0.4764 '0.008 | 0.3889 '0.009 | 0.3386 '0.008 | 0.3216 '0.008 | 0.2232 '0.007 | 0.1778 '0.006 | 0.1660 '0.005 |
| 40 | 1.001 '0.048 | 0.626 '0.017 | 0.4528 '0.013 | 0.4493 '0.022 | 0.1328 '0.012 | 0.0943 '0.005 | 0.0912 '0.014 | 0.0874 '0.013 |

| % TRATAMIENTOS | | | | | | | | |
|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| TIEMPO hrs | CTRL | CHX.1 | CHX 1 | CHX 10 | CP | CP-CHX.1 | CP-CHX 1 | CP-CHX 10 |
| 0 | 100 '3.1 | 100 '3.1 | 100 '3.1 | 100 '3.1 | 100 '3.1 | 100 '3.1 | 100 '3.1 | 100 '3.1 |
| 17 | 100 '1.6 | 85 '1.8 | 69 '2 | 60 '1.8 | 57 '1.8 | 40 '1.6 | 32 '1.4 | 19 '1.2 |
| 40 | 100 '11.5 | 62 '4 | 45 '3.1 | 44 '5.2 | 13 '2.8 | 9.4 '1.2 | 9.1 '3.3 | 8.7 '3.10 |

-ZINC

| x TRATAMIENTOS | | | | | | | | |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| TIEMPO hrs | CTRL | ZINC-1 | ZINC-.5 | ZINC-.25 | CP | CP-ZN-1 | CP-ZN-.5 | CP-ZN-.25 |
| 0 | 0.411 *0.014 |
| 24 | 0.507 *0.026 | 0.149 *0.032 | 0.075 *0.012 | 0.145 *0.043 | 0.222 *0.033 | 0.082 *0.010 | 0.083 *0.012 | 0.125 *0.004 |
| 48 | 0.741 *0.084 | 0.164 *0.003 | 0.092 *0.034 | 0.120 *0.113 | 0.258 *0.018 | 0.087 *0.002 | 0.088 *0.002 | 0.100 *0.016 |

| % TRATAMIENTOS | | | | | | | | |
|----------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| TIEMPO hrs | CTRL | ZINC-1 | ZINC-.5 | ZINC-.25 | CP | CP-ZN-1 | CP-ZN-.5 | CP-ZN-.25 |
| 0 | 100 *3 | 100 *3 | 100 *3 | 100 *3 | 100 *3 | 100 *3 | 100 *3 | 100 *3 |
| 24 | 100 *5 | 29 *6 | 14 *2 | 28 *8 | 43 *6 | 16 *2 | 16 *2 | 24 *0.7 |
| 48 | 100 *11 | 22 *0.4 | 12 *4 | 16 *15 | 34 *2.4 | 11 *0.2 | 11 *0.2 | 13 *2.1 |

RESULTADOS

Efecto de los quelantes EDTA y EGTA sobre el proceso apoptótico en células HeLa tratadas con cisplatino.

En la primera fase de la investigación se evaluó el efecto de los quelantes EDTA(1 mM) y EGTA(1 mM) en el proceso apoptótico de las células HeLa, inducido con cisplatino (40 μ M). Se midió la viabilidad con la técnica de MTT. En la figura 1A se presenta la curva de supervivencia en forma porcentual, donde se puede apreciar que las células HeLa tratadas con cisplatino durante 24 horas muestran una supervivencia de 60 %. Los tratamientos de EGTA-Cisplatino y EDTA-Cisplatino presentan mayor mortalidad celular en las primeras 24 horas, cuando se compara estos con la contra parte tratada solo con cisplatino, indicándonos una potenciación por parte de estos dos quelantes en el proceso apoptótico.

Cuando se aplicaron los quelantes solos, no existió diferencia sobre la curva de viabilidad a las dosis utilizadas. Al tratar a las células con una mayor concentración (>1 mM) estas perdían la morfología inmediatamente después de agregarles los quelantes, se tornándose totalmente redondas, por lo que se optó por utilizar solo la concentración de 1 mM.

Al analizar la morfología de los núcleos de las células, con la tinción de bromuro de etidio, figura 2 A, B y C se observó que las células tratadas con los quelantes (EDTA o EGTA) más cisplatino y las células tratadas solo con cisplatino presentan una morfología apoptótica, donde se aprecia la cromatina nuclear condensada y algunos cuerpos apoptóticos. Las células tratadas solo con EDTA o EGTA presentaron una morfología normal.

Para correlacionar estos resultados morfológicos con los efectos causados al ADN en estas células sometidas a los tratamientos antes descritos, se procedió a realizar la extracción del ADN, se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 % y se visualizaron bajo luz ultravioleta después de teñirlos con bromuro de etidio. Como se muestra en la figura 4E (carril A) el ADN de las células testigos y de las células tratadas con EDTA ó EGTA, figura 4E (carril C) y figura 4F (carril A) no sufrieron fragmentación alguna. Las células tratadas con cisplatino (figura 4E (carril B)) ó con cisplatino y EDTA ó EGTA, que se muestran en las figuras 4E (carril D) y 4F (carril B) no inhibieron la fragmentación específica en el proceso apoptótico.

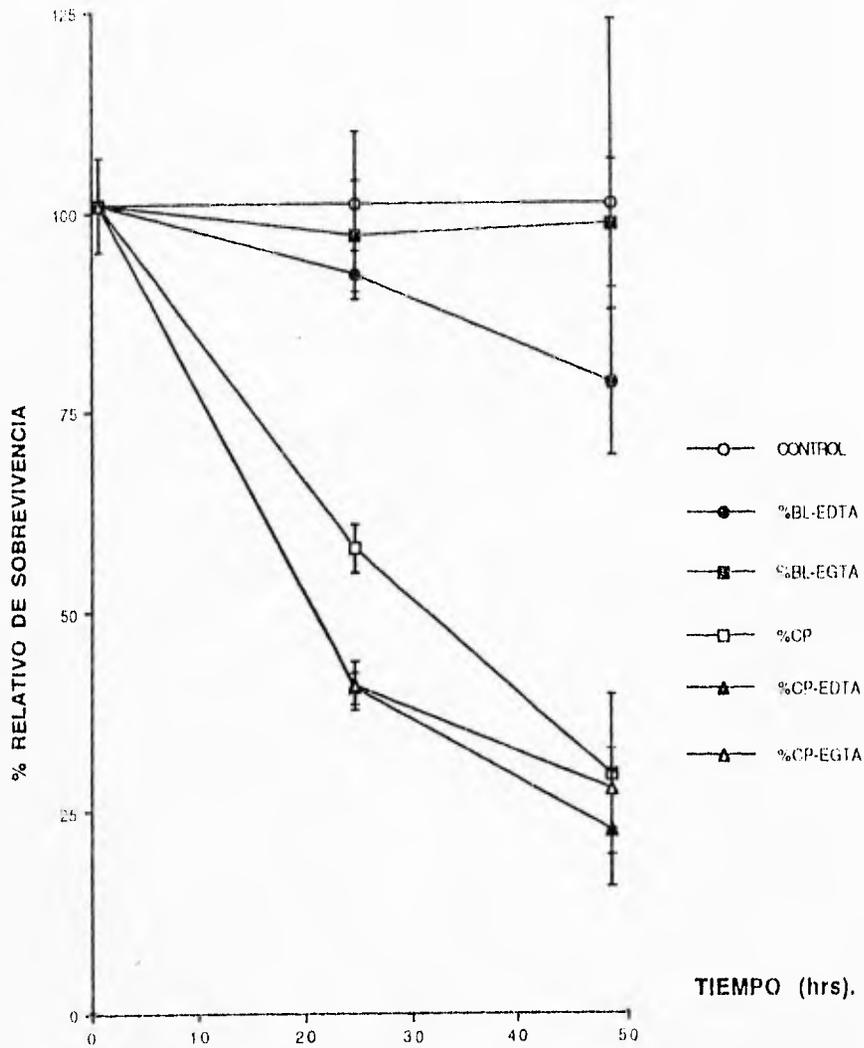


FIG.1A. Células HeLa tratadas con los quelantes EDTA (1 mM) y EGTA (1mM), más Cisplatino (40 μ M). Se indica la desviación estándar.

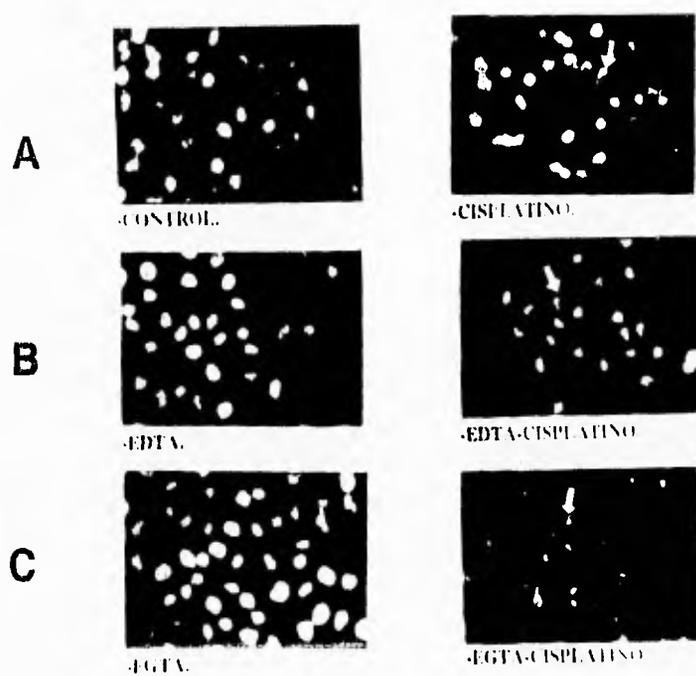


Fig.2. Fluorescencia por bromuro de etidio (10 $\mu\text{g/ml}$) en células HeLa, tratadas con EDTA (1mM), EGTA (1mM) y Cisplatino (40 μM) y con los mismos quelantes más cisplatino observadas a las 18 hrs del tratamiento en un microscopio de fluorescencia (40 X). La flecha indica una célula en apoptosis (cuerpos apoptóticos).

Efectos de los inhibidores de síntesis de macromoléculas Cicloheximida y Actinomicina D en el proceso apoptótico en células HeLa tratadas con cisplatino.

En la segunda fase de este estudio se analizó el efecto de los inhibidores de síntesis de macromoléculas Actinomicina D y Cicloheximida a diferentes concentraciones, en el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino. Para este fin se realizó una estimación de la viabilidad celular mediante la técnica de MTT como se describe en la sección "material y métodos".

Como se muestra en la figura 1B las células pre-tratadas durante dos horas con el inhibidor de síntesis de ARN (actinomicina D), a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 μM) muestran una considerable mortalidad a las pocas horas (menos de 20 horas) después del tratamiento. Esta disminución es dependiente de la concentración de la actinomicina D. Las células tratadas con cisplatino (40 μM), más actinomicina D a diversas concentraciones muestran una mayor mortalidad que las células tratadas solo con cisplatino. El tratamiento solo con actinomicina D a cualquier concentración provoca una disminución de la viabilidad celular.

Se realizó un análisis morfológico con la técnica de fluorescencia con bromuro de etidio. Las células se recolectaron a las 18 hrs después del tratamiento ya que es cuando se puede observar claramente la apoptosis en células expuestas a cisplatino. La figura 3C (lado derecho) muestra los núcleos de células tratadas con actinomicina D (0.1 $\mu\text{g/ml}$) la cual muestra algunas células apoptóticas, que no se presentan en las células testigo (figura 2A), el cultivo tratado con actinomicina D y cisplatino (figura 3 C) presentó mayor número de células apoptóticas que el cultivo expuesto solo a cisplatino (figura 2A).

Para corroborar la información obtenida en el análisis morfológico, se procedió a realizar el análisis de ADN, de bajo peso molecular. Se muestran los resultados en la figura 4F (carril C y D), en las células tratadas solo con actinomicina D no se detectó fragmentación de ADN figura 4F (C). La fragmentación de ADN no se inhibió en las células tratadas con cisplatino más actinomicina, presentándose el "ladder" figura 4F(D), al igual que en las células tratadas solo con cisplatino (figura 4E carril B).

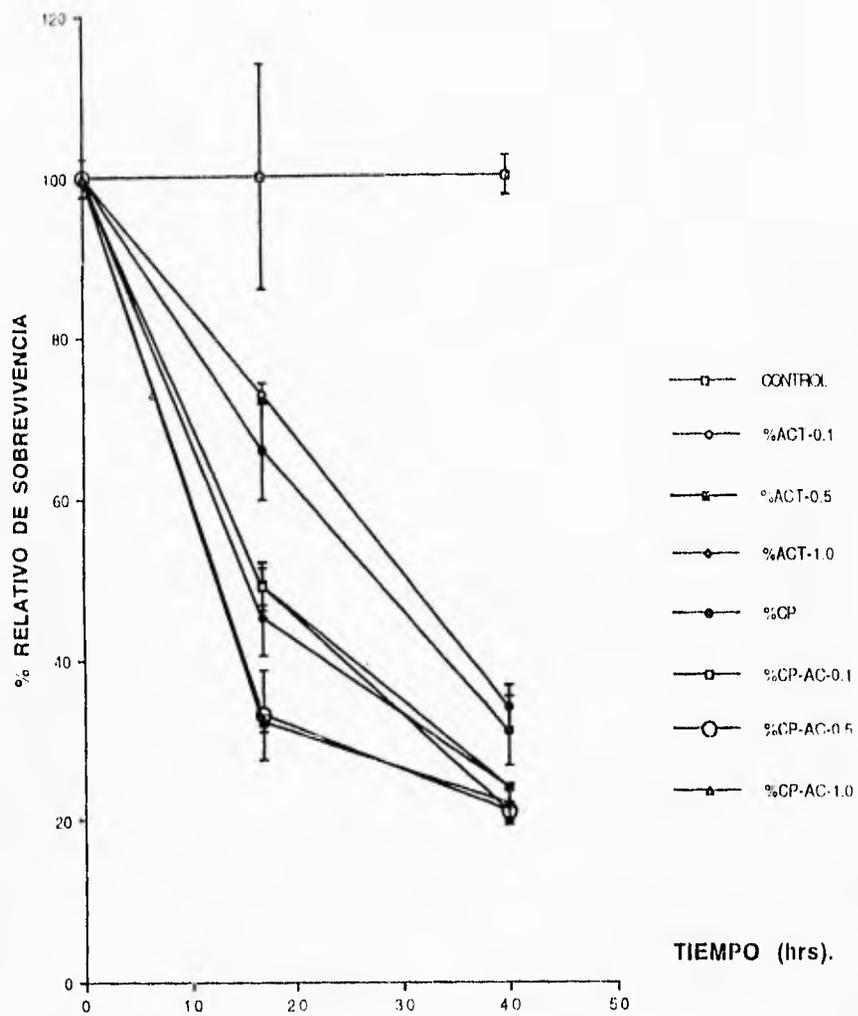


FIG.1B. Células HeLa tratadas con Actinomicina (0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$), más Cisplatino (40 μM). Se indica la desviación estándar.

Al pre-tratar las células con diferentes concentraciones (0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g/ml}$) de cicloheximida (inhibidor de síntesis de proteínas), se encontraron resultados similares a los que se obtuvieron pre-tratando con el inhibidor de síntesis de ARN. El análisis de viabilidad (figura 1C) reveló que la cicloheximida por si misma causó una pérdida de la viabilidad celular comparada con las células testigo y esta pérdida fue proporcional a la concentración del químico. Aún concentraciones pequeñas como 0.1 $\mu\text{g/ml}$ causaron la muerte celular. Las células a las cuales se les pre-trató por dos horas con la cicloheximida y después se trataron con cisplatino muestran una curva de viabilidad por debajo de las células tratadas solo con cisplatino, así por ejemplo a las 18 hrs las células tratadas con cisplatino muestran una viabilidad del 60 %, y las células tratadas con cicloheximida y cisplatino muestran una viabilidad de 58, 40 y 20 % dependiendo de la concentración de cicloheximida utilizada.

Después se procedió a realizar el análisis morfológico. Las células se recolectaron a las 18 horas post-tratamiento y se utilizó la cicloheximida a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. las células se fijaron con etanol y se tñeron con bromuro de etidio. Como se aprecia en la figura 3B algunas células tratadas con cicloheximida mostraron morfología apoptótica, con núcleos condensados y se pueden visualizar algunos cuerpos apoptóticos que no se aprecian en las células sin tratamiento (figura 2A). la mayoría de las células tratadas con cisplatino y cicloheximida mostraron una morfología apoptótica superando el número encontrado en células tratadas solo con cisplatino.

A continuación se procedió a realizar el análisis del ADN de las células, bajo las condiciones descritas anteriormente. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 4g (carril A y B), el ADN de las células tratadas con cicloheximida, muestran un patrón normal de corrimiento en los geles de agarosa, semejante al que se presenta en las células testigo, en cambio en el ADN de las células tratadas con cisplatino ó cisplatino más cicloheximida presentan el patrón de fragmentación característico de células en apoptosis.

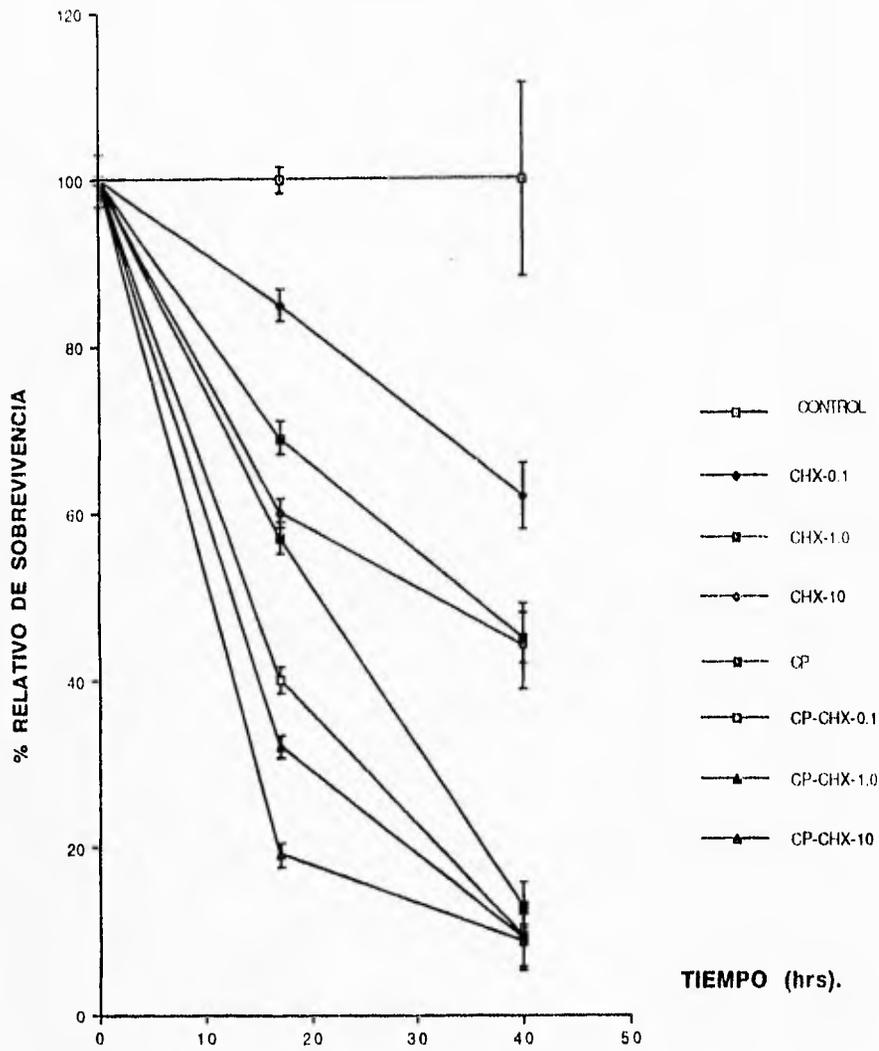


FIG.1C. Células Hela tratadas con cicloheximida (0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g/ml}$), más Cisplatino (40 μM). Se indica la desviación estándar.

Efecto del Zinc sobre el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino.

En una tercera fase de la investigación, se evaluó el efecto causado por diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 mM) de sulfato de zinc en el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino (40 μ M). Se midió la viabilidad durante un curso temporal (0, 24, y 48 hrs) mediante la técnica de MTT. La figura 1D muestra los resultados, en donde se puede apreciar que las células tratadas con zinc o con zinc más cisplatino presentan un decremento de la viabilidad mayor que el presentado en las células tratadas solo con cisplatino. Por ejemplo aproximadamente a las 20 hrs las células tratadas con cisplatino presentan una viabilidad de 50% comparadas con las células testigo, si bien las células con zinc ó zinc más cisplatino presentan una viabilidad de solo 30 % comparadas con las células testigos.

Al realizar el análisis morfológico tiñendo el ADN con bromuro de etidio, se encontró que las células tratadas con zinc presentan un núcleo condensado en forma arrionada, mientras tanto, las células tratadas con cisplatino más zinc presentan una morfología inusual, no forman cuerpos apoptóticos y con el bromuro de etidio se muestran un par de manchas que podrían ser ADN condensado o los nucléolos (fig.3A). Después de este análisis morfológico se procedió a efectuar el análisis de ADN, en el cual se extrajo el ADN de las células testigo y las células con tratamiento, este se corrió en un gel de agarosa, como se muestra en la figura 4G (carril C y D). En el cultivo de células expuestas con zinc no se aprecia fragmentación. En las células con zinc más cisplatino el ADN genómico migra de manera más lenta, lo cual puede deberse a un estado de supercondensación y una degradación parecida a la que se presenta en células con necrosis. No se presenta la fragmentación característica de apoptosis.

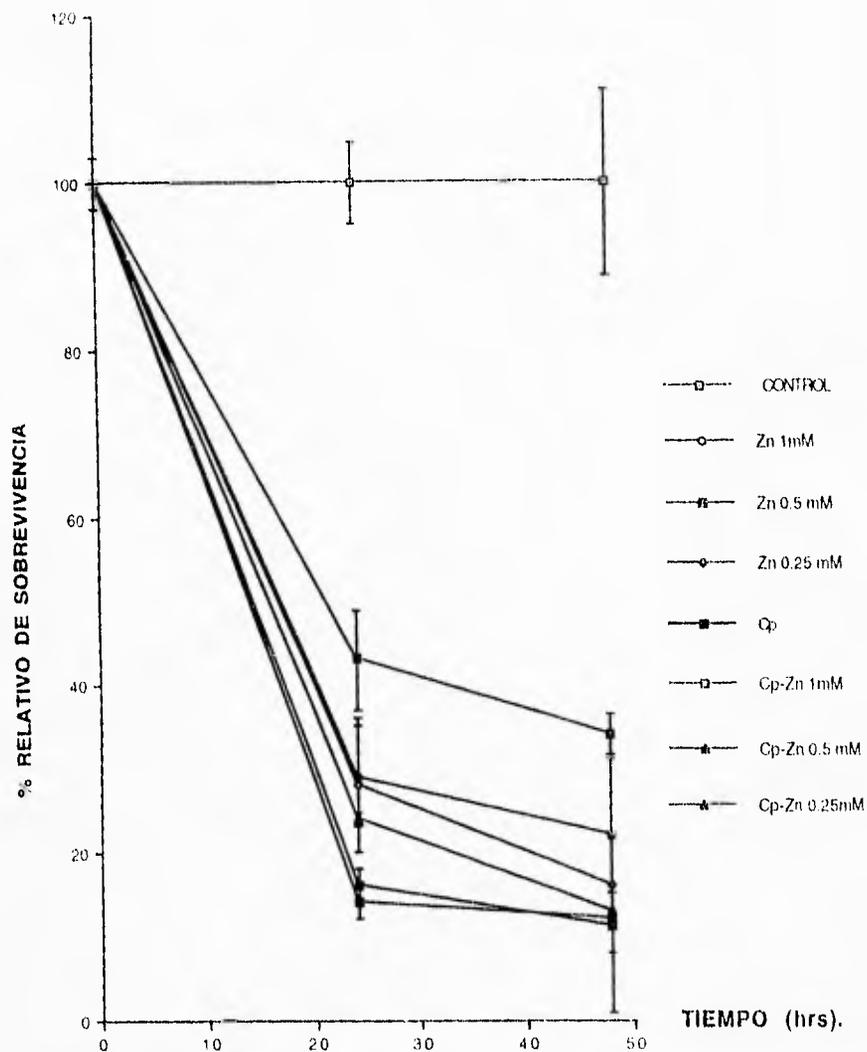


FIG.1D. Células HeLa tratadas con Zinc (0.25, 0.5, 1.0 mM), más Cisplatino (40 μ M). Se Indica la desviación estándar.

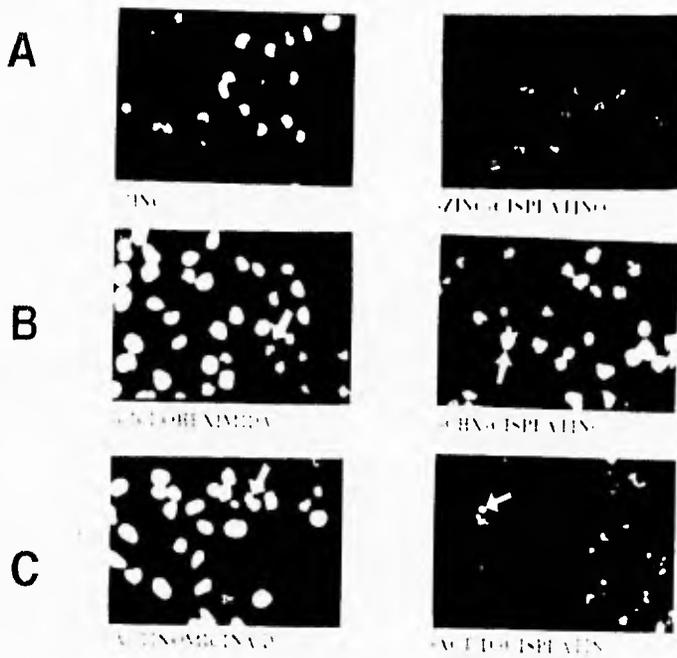


Fig.3. Fluorescencia por bromuro de etidio ($10 \mu\text{g/ml}$) en células HeLa, tratadas con Zinc (1mM), Cicloheximida ($1.0 \mu\text{g/ml}$) y Actinomicina ($0.1 \mu\text{g/ml}$), observadas a las 18 hrs del tratamiento en un microscopio de fluorescencia ($40\times$). La flecha indica una célula apoptótica (cuerpos apoptóticos).

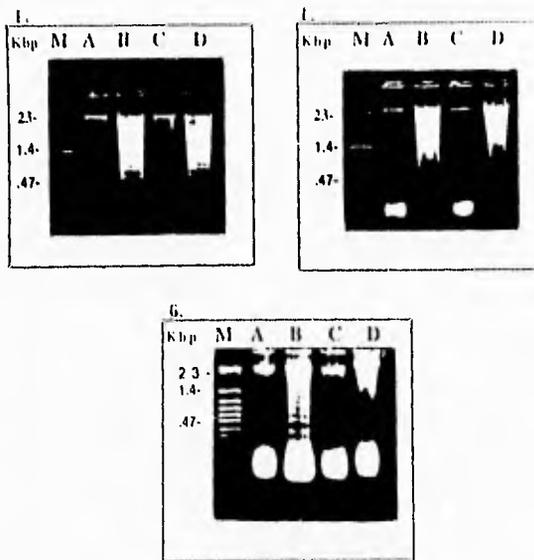


Fig.4. Electroforesis en gel de Agarosa (0.8 %), análisis del ADN de células Hela, efectos causados por EDTA, EGTA, Zinc, Actinomicina y Cicloheximida a las 18 hrs de tratamiento. Técnica descrita previamente para la extracción de fragmentos de ADN. E) M (marcador de peso molecular), A y C (control y EDTA), B y D (Cisplatino y EDTA + Cp) respectivamente. F) M (marcador), A y C (EGTA y Actinomicina), B y D (EGTA + Cp y Actinomicina + Cp). G) M (marcador), A y C (Cicloheximida y Zinc), B y D (Cicloheximida + Cp y Zinc + Cp) respectivamente.

DISCUSION

El papel que comprende el calcio como agente regulador del proceso apoptótico es muy relevante. Las primeras evidencias surgen de estudios que mostraron que la elevación de calcio citosólico (Ca^{2+}) indujo apoptosis en timocitos (22).

El mecanismo preciso por el cual el calcio interviene en la muerte celular no se conoce, si bien existen endonucleasas dependientes de calcio y magnesio, que median el rompimiento de ADN en las regiones nucleosómicas, por lo que estas enzimas son un blanco atractivo para el efecto del calcio. En general se han propuesto principalmente dos endonucleasas responsables de la fragmentación del ADN en el proceso apoptótico, la ADNasa I, que es dependiente de calcio y magnesio y la ADNasa II que es independiente de calcio y magnesio (44). También se ha implicado una endonucleasa relacionada con ciclofilina A, así como otras no identificadas con un peso alrededor de 20-40 Kda. Recientemente se ha detectado una enzima de 18Kda (NUC-18) en timocitos (54). Se ha sugerido que esta enzima es un cofactor de la ADNasa I.

Se ha demostrado que inhibidores de estas endonucleasas inhiben la fragmentación de ADN y la apoptosis, sugiriendo que existe una relación casual. También se ha demostrado que el tratamiento con quelantes de calcio y/o magnesio, logran inhibir la apoptosis en timocitos (30). De la misma manera, en células del bazo, se han propuesto que existe una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio, que participa en la digestión del ADN en la muerte apoptótica de estas células. Esta endonucleasa propuesta se inhibe con EGTA.

Los resultados del tratamiento con ionóforos de calcio como A23187, los cuales inducen apoptosis en muchos tipos celulares, sugieren que el influjo de calcio puede disparar la apoptosis. En timocitos se ha reportado que el aumento inicial de calcio va de 85-100 nM (concentración normal) a 300-800 nM durante la apoptosis. La fuente de Ca^{2+} parece ser predominantemente extracelular, ya que el cultivo de células, en medio libre de calcio previene la apoptosis (11).

Alternativamente un aumento de calcio citosólico puede disparar eventos secundarios donde estén involucradas otras enzimas dependientes de Ca^{2+} por ejemplo la transglutaminasa, una enzima que cataliza enlaces E(a-glutamil)lisina entre proteínas

ESTA TESIS NO ESTÁ
SUJETA A LA PROPIEDAD

formando una red, que ayuda a la formación de los cuerpos apoptóticos, la cual está involucrada en el proceso apoptótico de diversos sistemas (45). Recientemente también se ha demostrado que la calmodulina (proteína que une calcio) está involucrada en el proceso apoptótico, e inhibidores de esta, inhiben la fragmentación de ADN y la apoptosis en timocitos tratados con glucocorticoides. Además un aumento en la expresión de la calmodulina se ha observado en células del timo de ratón (WEHI) tratadas con glucocorticoides. Otra proteína posiblemente implicada es la calbindinaD28K (proteína que une calcio dependiente de la vitamina E) la cual se ha demostrado que protege contra la apoptosis en células de próstata.

La elevación de Ca^{2+} intracelular, no es un requerimiento universal para la iniciación de la apoptosis. La inducción de la apoptosis por dexametasona o novobiocin (un inhibidor de la topoisomerasa II) en células linfocíticas humanas CEM-C7 parece ser independiente de la toma de calcio (47,48). Además en células HL60 (células de leucemia promielocíticas) inducidas a apoptosis con ionóforos de calcio, la aparición de la fragmentación del ADN se correlacionó temporalmente con la acidificación intracelular, en lugar del aumento de la concentración de calcio intracelular (11). En otros sistemas se ha encontrado que el aumento de calcio intracelular se presenta en las últimas fases del proceso apoptótico, lo que indica que el calcio puede jugar diferentes papeles a diferentes tiempos durante el proceso apoptótico (11).

Recientemente se observó que las células HeLa experimentan apoptosis al tratarse con cisplatino presentando tanto la morfología y la fragmentación del ADN internucleosomal característicos de la muerte por apoptosis (36). Con el fin de caracterizar mejor este modelo intentamos inhibir el proceso con los quelantes de Ca^{2+} y Mg^{2+} (EDTA y EGTA). Con los resultados obtenidos demostramos que el EDTA y EGTA no son capaces de inhibir el proceso apoptótico o la fragmentación de ADN de células HeLa tratadas con cisplatino, como ocurre en otros sistemas. Con estos resultados no podemos asegurar que este proceso no dependa de una endonucleasa dependiente de calcio y magnesio, para ello se requieren más estudios, por ejemplo el medir el calcio intracelular y los diferentes depósitos que existen en la célula.

En varias estirpes celulares la apoptosis es percibida como un proceso de muerte celular activo, el cual parece genéticamente controlado. Se ha reportado que el proceso apoptótico requiere de la síntesis de proteínas específicas para llevarse a cabo, como también de la transcripción de ARNm específicos, como se ha demostrado en Caenorhabditis elegans, en el cual los genes *ced-3* y *ced-4* participan en la inducción de la apoptosis (41). Estas suposiciones están basadas principalmente en estudios donde se han reportado que inhibidores de macromoléculas entre otros la cicloheximida, emitina, y actinomicina D previenen la apoptosis de timocitos, los cuales han sido previamente irradiados, o tratados con glucocorticoides e ionóforos (31-32).

Así como en la apoptosis de timocitos, la síntesis de ARNm y proteínas es necesaria para llevar a cabo este proceso apoptótico, también ha sido demostrado en la apoptosis de células del ovario de hámster chino, células mieloides de leucemia, neuronas, y células linfocíticas de leucemia crónica (11).

En este estudio al realizar pruebas experimentales en células HeLa tratadas con el inhibidor de la transcripción (actinomicina D), se mostró que este no es capaz de inhibir la muerte por apoptosis inducida con cisplatino. Por otra parte la actinomicina D por si misma parece activar este proceso, como ocurre en diversos sistemas (33-35).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprueba en primera instancia, que la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, tampoco es capaz de inhibir el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con el antineoplásico cisplatino. Se ha reportado que la síntesis de una proteína requerida en el proceso apoptótico no es universal para todo tipo de apoptosis celular. Uno de los primeros estudios que demostraron que la apoptosis procede en presencia de inhibidores de proteínas, fué hecho por Duke et al.,(55) quienes reportaron que la apoptosis de linfocitos citotóxicos T no se bloqueaba. Ahora existen numerosos ejemplos en donde la apoptosis se lleva a cabo en presencia de inhibidores de macromoléculas, células de leucemia humanas HL-60, queratinocitos, células de linfoma de ratón S46, células CEM-C7, y macrófagos, hepatocitos, (11, 38, 39, 43). En algunos de estos sistemas los inhibidores de macromoléculas, no solamente no protegen de la apoptosis, sino estos mismos la inducen.

Esto sugiere que existen diferentes mecanismos para la inducción de apoptosis, dependiendo del tipo celular (11).

Posiblemente en la línea celular de HeLa derivada de cáncer cervicouterino, el proceso apoptótico se encuentre inhibido por una proteína, la cual podría dejar de sintetizarse con los inhibidores de macromoléculas como la actinomicina D y la cicloheximida disparando en menos de 24 horas la apoptosis en estas células. Esto señalaría hacia la existencia previa de todos los factores necesarios para que se lleve a cabo el proceso apoptótico.

Los cationes divalentes Zn^{2+} bloquean la apoptosis en una amplia variedad de sistemas. Su sitio de acción permanece incierto, se ha visto que la activación de las endonucleasas durante la apoptosis es inhibida por iones Zn^{2+} , esto se ha comprobado en macrófagos (37, 39), células del bazo (11), Células HeLa tratadas con Vp-16 (8) así como en núcleos aislados. Recientes estudios han demostrado que si bien los cambios nucleares asociados con apoptosis pueden ser bloqueados por Zn^{2+} , los cambios citoplasmáticos en este proceso se llevan a cabo normalmente. En timocitos tratados con zinc (1 mM), mediante microscopía electrónica se han observado etapas tempranas de la apoptosis, lográndose detectar la membrana nuclear intacta, pero con convoluciones, la eucromatina mantiene una densidad normal. Estas características han sido descritas en las primeras etapas de iniciación de la apoptosis en algunas estirpes celulares. Por otra parte en este mismo modelo experimental, no se observa el "ladder", suponiendo con esto, que las rupturas del ADN son hechas en etapas tardías del proceso apoptótico.

Ya que ni los quelantes ni los inhibidores de macromoléculas inhibieron la apoptosis en células HeLa decidimos evaluar los efectos causados por el zinc, usando sulfato de zinc en este sistema.

Con los resultados obtenidos, se muestra que el zinc puede inhibir el proceso apoptótico o por lo menos la fase final del proceso ya que no se detectaron cuerpos apoptóticos en el cultivo expuestos a zinc-cisplatino. Si bien la viabilidad celular disminuye y la morfología de las células no es común, el zinc no rescata a las células de la muerte, al parecer solo interfiere con el proceso apoptótico. La morfología de las células expuestas a zinc más cisplatino no es claramente necrótica pero tampoco apoptótica, posiblemente exista otro mecanismo de muerte desconocido, por el cual el zinc de muerte a estas células. Hay que tomar en cuenta que la necrosis y la apoptosis no son dos tipos de muerte celular opuestos sino más bien es un continuo, en el cual pudieran compartir ciertas características. La condensación de la cromatina en forma arriñonada obtenida en el cultivo tratado solo con zinc es morfológicamente distinta, a la descrita para la apoptosis y la necrosis. Aunque actualmente no se conoce la manera en la que el zinc participa en la fragmentación del ADN en la apoptosis, se piensa que el zinc puede estar directamente afectando vías fisiológicas importantes (8).

El zinc quizá juegue un doble papel tanto de iniciador de la apoptosis en etapas tempranas como de inhibidor de la apoptosis en etapas tardías (40). El zinc ha sido implicado como un bloqueador de la Ca ATPasa (Bomba de Calcio), con ello tal vez inhibe la entrada de calcio a la célula, así impidiendo que se active la endonucleasa dependiente de calcio (42).

Los resultados obtenidos señalan que el zinc probablemente inhiba a la endonucleasa responsable de la degradación internucleosomal del ADN, ya que no se presenta el "ladder" característico. Esta suposición esta apoyada por el hecho de que no existe fragmentación nuclear en las células tratadas con cisplatino y zinc y por ende, no se presentan cuerpos apoptóticos. finalmente no se puede excluir una posible modificación estructural del ADN, como responsable de la inhibición del rompimiento regular del ADN, dada la presencia de una movilidad anormal del ADN genómico.

CONCLUSIONES

Los quelantes EDTA y EGTA no inhibieron el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino.

Los inhibidores de la síntesis de macromoléculas (actinomicina y cicloheximida) no son capaces de inhibir el proceso apoptótico, en este modelo experimental, al contrario, estos inhibidores macromoleculares indujeron apoptosis por si mismos en células HeLa.

El zinc fue capaz de inhibir el proceso apoptótico de células HeLa tratadas con cisplatino. Aunque el zinc no es capaz de bloquear la muerte celular.

La morfología de las células HeLa expuestas al zinc más cisplatino, no es claramente necrótica ni apoptótica.

REFERENCIAS

1. Gerschenson L.E y Rotello R.J. 1992 Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB*, 6: (2450-2455).
2. Tomei D.L y Cope O.F. 1991. Apoptosis: The molecular basis of cell death. Cold Spring Harbor Laboratory Press, The Ohio state University, Columbus Ohio, USA. 5-21 pp.
3. Cohen John J. 1994. Apoptosis el proceso fisiológico de muerte celular. *Fisiopatología*; (439-448).
4. Alles A., Alley K., Barrett J. C., Buttyan R., Columbano A., Cope F.O., Copelan E. A., Duke R. C., Farrell P. B., Gerschenson L. E., Goldgaber D. G., Green D. R., Honn K. V., Hully J., Michaelson J.T.J., Schulte-Hermann R., Server A.C., Szende B., Tomei L. D., Tritton T. R., Umansky S. Valerie R., y Warner H.R. . 1991. Apoptosis: a general comment. *NEWS*. Vol 5., (2127-2128).
5. Vaux D.L. 1993. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol 90 (786 -789).
6. Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. Vol 267., (1445-1449).
7. Lohmann R. D., y Beyersman D 1994. Effects of Zinc and Cadmium on apoptotic DNA fragmentation in isolated Bovine Liver nuclei. *Environ Health Perspect.* 102 (suppl 3) : (269-271).
8. Guano F., Bernardi R., Negri C., Donzelli M., Prosperi E., Ricotti G. A., y Scovassi A. S. 1994. Dose-depend Zinc inhibition on DNA ladder in apoptotic HeLa cells regulates the activity of (poly ADP-ribosa) polimerasa and does not protect from death induce by VP-16. *Cell Death and differentiation*, Vol: 1 (101-107).
9. Williams Gwyn T. y Smit Christopher A. 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death (Minireview). *Cell*. Vol 74., (777-779).
10. Walker P. Roy , Pandey Siyaram y Sikorska Mariana. 1995. Degradation of chromatin in apoptotic cells. *Cell Death and diferentiation*. Vol 2 ., (97-104).
11. Schwartzman Robert A. y Cidlowski John A. 1993. Apoptosis : The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. *Endocrine Reviews*. Vol 4 No 2., (133-155).
12. IPE. 1993. *Vademecum Farmaceutica*. 1 da edición. Rezza S.A. México D.F., 1209.

13. Hay Robert. 1985. Catalogue of cell lines and hibridomas. American tipe culture collection.
14. Nagata Shigekazu y Golstein Pierre. 1995. The fas Death factor. *Science*. Vol 267., (1449-1455).
15. Eagle Harry. 1955. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*. Vol 122., No 3168 (17-20).
16. Katzung B.G. 1991. *Farmacología Basica y Clínica. El Manual Moderno*. México D.F. 743 pp.
17. Meyers. F.H, Jawetz. E., Goffien A. 1977. *Manual de Farmacología Clínica. Manual Moderno*. México D.F. 592 pp
18. Chu Gilbert. 1994. Cellular responses to cisplatino. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol 269 (2) (787-790).
19. Minng-Hsiu Wu y Bejamin Yat-Ming Yung. 1994. Cell cycle phase-dependent citotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *European Journal of Pharmacology*. Vol 270 (203-212).
20. Evans Dyfed L. y Dive Caroline. 1993. Effects of Cisplatin on the induction of apoptosis en proliferating Hepatoma Cells and Nonproliferating inmature Thymocytes. *Cancer Research*. Vol 53 (2133-2139).
21. Voipe P y Eremenko T. 1973. *Methods in Cell Biology*. Prescott D M Editor. Academic Press. USA. Vol VI, Chaper 4 (113-126).
22. Szondy Zsuza. 1994. Adenosine stimulates DNA fragmentation in human thymocytes by Calcio-mediated mechanisms. 304, pt 3 (877-885).
23. Nakagawa-Yagi Yuzo. 1994. Induction of Apoptotic Cell Death in differentiating Neuroblastoma SH-SY5Y Cells by colchicina. *Biochemical and Biophysical Research Comunnications*. Vol 199 (2) (807-817).
24. Chow Sek C., Peters Iris., y Orrenius Sten. 1995. Reevaluation of the Role of the Novo Protein Sintesis in Rat Thymocyte Apoptosis. *Experimental Cell Research*. Vol 216 (149-159).
25. McConkey D.J., Hartzell P., Nicotera P., Orrenius S. 1989. Calcium-Activated DNA Fragmentation Kills Inmature Thymocytes. *FASEB J* Vol 3 (1843-1849).

26. Ribeiro Joao Meireles y Carson Dennis A. 1993. Ca⁺/Mg⁺-Dependent endonucleasa from Human Spleen purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*. Vol 175 (9129-9136).
27. Lianfa Shi, Ricky P. Kraut, Ruedi Aebersold y Arnold H. Greenberg. 1992. A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J. Exp. Med.* Vol 175 (553-556).
28. Isabelle Escargueil- Polanc, Robert Salvagre y Anne Nègre-Salvayre. 1994. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB Journal* Vol 8 (1075-1080).
29. Burchiel S. W, Davis D.A, Ray S.D, Barton S.L. 1993. DMBA induces programmed cell death (apoptosis) in the A20.1 murine B cell lymphoma. *Fundam Appl Toxicol.* Vol 21 (120-124).
30. McConkey D.J, Hartzell P, Duddy S.K, Hakansson H. y Orrenius S. 1988. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo dioxin kills immature thymocytes by Ca²⁺ mediated endonuclease activation. *Science*. Vol.242 (256-259).
31. Yamada T. y Ohyama H. 1980. Separation of the dead cell fraction from X-irradiated rat thymocyte suspensions by density gradient centrifugation. *Int. J. Radiat. Biol.* Vol 37 (695-9).
32. Kizaki H., Tadakuma T., Muramatsu J. y Isimura Y. 1989. Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters. *J Immunol.* Vol 143 (1790).
33. Kaufmann S.H. 1989. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cautionary note. *Cancer Res.* Vol 49 (5870).
34. Griffiths G. D., Leek M.D., y Gee D.J. 1987. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. *Pathol.* Vol. 151 (221-229).
35. Searle J., Lawson T. A., Abbott P. J., Harmon B., Kerr JFR. 1975. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cell. *J Pathol.* Vol. 116 (129-138).
36. Maldonado, V., Melendez J., González, H., y Ortega, A. 1995. Internucleosomal DNA cleavage in HeLa cells exposed to cisplatin. *Biochem. Mol. Biol. Int.* Vol 37 (691-696).

37. Waring P., Egan M., Braithwaite A., Mullbacher A., Sjaarde A. 1990. Apoptosis induced in macrophages and T blasts by the mycotoxin sporidesmin and protection by Zinc salts. *Int. J. Immunopharmacol.* Vol 12 (445-457).
38. Seamus J. Martin, Seamus V. Lennon, Aine M. Bonham and Thomas G. Cotter. 1990. Induction of apoptosis (programmed Cell Death) in human Leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J. Immunology.* Vol 145 (1859-1867).
39. Paul Waring. 1990. DNA fragmentation induced in macrophages by gliotoxin does not require protein synthesis and is preceded by raised inositol triphosphate levels. *J. Biol. Chem.* Vol 265 (14476-14480).
40. Gerald M. Cohen, Xiao-Ming Sun, Roger T. Snowden, David Disnsdale y David N. Skilleter. 1992. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *J. Biochem.* Vol 386 (331-334).
41. Michael m. Gottesman. 1994. Report of a Meeting; Molecular Basis of Cancer. *J. Natl. Cancer. int.* Vol 86 (1277-1285).
42. Bowen Ivor D. y Bowen maureen S. 1990. Programmer cell death in tumors and tissues. ed. Chapman and hall. london,. Great Britain. p 97.
43. Faa G, Ledda-Columbano G. M., Ambu R., Congiu T., Coni P., Riva A., Columbano A. 1994. An electron microscopic study of apoptosis induced by cycloheximide in rat liver. *Liver.* Vol 14 (270-278).
44. Mannherz H.G., Peitsch M.C., Zannotti S., Paddenbery R. Polzar. 1995. A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* p(161-172).
45. Piacentini M. 1995. Tissue Transglutaminase: A candidate Effector Element of Physiological Cell Death. *Curr Top Microbiol Immunol.* Vol.200 p(163-75).
46. Wyllie A.H. 1980. Glucocorticoides-induced Thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* Vol 284. (555-556).
47. Alnemri E.S, Litwack G. 1990 Activation of internucleosomal DNA cleavage in human CEM lymphocytes by glucocorticoides and novocin. Evidence for a non Ca^{2+} requiring mechanism (s). *J. Biol. Chem.* Vol 265. (17323-17333).
48. Alnemri E.S., Litwack G. 1989 Glucocorticoides-induced Lymphocytolysis is not mediated by an induced endonuclease. *J. Biol. Chem.* Vol 264. (4104-4111).

49. Lockskin R.A., Beaulaton J. 1981. Cell death: Questions for histochemists concerning the causes of the various cytological changes. *Histochem J.* Vol 13 (659-666).
50. M.G. Ormerod., C.F. O'NEILL., 'D. Roberson, y K.R. Harrap. 1994. Cisplatin induces Apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell. Res.* Vol 211 (231-237).
51. Deborah B. Zamble y stephen J. Lippard. 1995. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. reviews. *TIBS* (435-439).
52. Barry M. A., Behnke C.A., y Eastman A.1990. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins, and hiperthermia. *Biochem. Pharmacol.* Vol 40 (2353-2362).
53. Denizot F., Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods.* Vol 82 (271-277).
54. Marcia L. Gaido y John A. Cidlowski. 1991. Identification, purification and characterization of a Calcium-dependent endonuclease (NUC 18) from apoptotic rat thymocytes. *J Biol. Chem.* Vol 266 (18580-18585).
55. Duke R.C., Sellins K. S., Cohen JJ. 1988. Cytotoxic Lymphocyte derived lityc granuls do not induce DNA fragmentation in target cells. *J Immunol.* Vol 141 (2191-2194).
56. Cohen J. J., Duke R.C. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte leads to cell death. *J. Immunol.* Vol 132 (38-42).
57. Koizumi T., Walkes M.P. 1990. Effects of zinc on the binding of cadmium to DNA: assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNAs. *Toxic in Vitro.* Vol 4 (51-55).
58. Brüne B., Harzell P., Nicotera P., y Orrenius S. 1991. Spirmine prevents endonuclease activation y Apoptosis in thymocytes. *Exp. Cell Research.* Vol 195 (323-329).
59. Fichtinger-Schepman AMJ, Van Den Veer LJ, Den Hartog HJJ, Lohman MPH, Reedijk J. 1985. Adducts of the antitumor drug cis-diaminedichloro platinum (II) with DNA: Formation, identification and quantation. *Biochemistry.* Vol 24 (707-703).
60. Roach I.J., Erenpreisa J y Aigner T.1996. Ostogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *Cell Biology.* Vol 131 (483-494).

APENDICE.

Viabilidad celular.

Cultivo celular.

Material biológico.-Células cancerosas del cervix uterino (células HeLa).

Instrumental

- . Campana de flujo laminar.
- . Autoclave.
- . Microscopio óptico.
- . Espectrofotómetro Beckman.
- . Microfuga E Beckman.
- . Centrifuga Hettich.
- . Incubadora Fisher Scientific.
- . Refrigerador.
- . Congeladora.
- . Hemocitometro.

Material esterilizado.

- . Pipetas serológicas de 5 ml y 10 ml.
- . Pipetas pasteur.
- . Micropipetas y puntas aplicadoras.
- . Frascos de Cultivo Falcon.
- . Cajas multipozos de plástico.

Tubos de ensaye de 15 ml.

Microtubos y pisetas.

REACTIVOS

-Medio de cultivo DMEM con 10 % de suero fetal bovino, antibióticos y fenol.

-PBS(amortiguador salino de fosfatos).

-BSA(suero bovino con albúmina).

SOLUCIONES.

-Tripsina.

-Agua destilada y desionizada.

-EDTA 1mM.

-EGTA 1mM.

-SO₄Zn(0.25, 0.5, 1 mM).

-Cisplatino(40 μM).

-Actinomicina (0.1, 0.5, 1.0 μg/ml).

-Cicloheximida (0.1, 1.0, 10 μg/ml).

-Solución de MTT 0.5mg/ml.

El MTT es una sal amarilla tetrazolum, insoluble en agua, las enzimas deshidrogenasas de la mitocondria, rompen el anillo de tetrazolum y forman un compuesto color purpura denominado formazan, este puede ser medido espectrofotometricamente disolviendolo en isopropanol.

-Solución de HCl en isopropanol 0.4 M.

-Solución para tripsinizar (PBS-10 ml + 50 μl de tripsina).

ANALISIS DEL ADN (ELECTROFORESIS).

INTRUMENTAL.

- Probeta de 200 ml
- Parafilm.
- Balanza de precisión.
- Matraz erlenmeyer de 250 ml.
- Horno de microondas.
- Ultracentrifuga.
- Camara de electroforesis con peine.
- Microfuga.
- Tubos de centrifuga.
- Fuentes de poder con electrodos.
- Autoclave.
- transiluminador.
- Gendarmes.

REACTIVOS.

- Agarosa 0.8 grs.
- Agua destilada 100 ml.
- Bufer tris de boratos EDTA (TBE) 0.5 X
- Bromuro de etidio 10 μ g/ml.

Preparación del amortiguador TBE.

Para un litro de solución stock 5X:

Se peso 54 grs de tris base y 27.5 de ácido bórico y se preparó 20 ml de solución EDTA 0.5 M con pH=8.0. Todo se agregó a un vaso de precipitado de 1 litro, se aforó con agua destilada y se disolvió con un agitador magnetico, la solución se esterilizó y se guardo en un frasco. Para obtener TBE 0.5X se agregaron 20 ml de TBE 5X a una probeta de 200 ml la cual se aforó y resuspendió con agua destilada.

Elaboración y corrimiento del gel.

Se pesaron 0.8 grs de agarosa disueltos en 100 ml de amortiguador. Esta solución se vertió en la cámara de electroforesis de manera que se obtuviera una capa de gel de 1 cm de espesor. Al gelificarse la solución se extrajo el peine y el gel estaba listo con sus pozos (carriles) moldeados.

Se añadió suficiente amortiguador a la cámara con el gel ya montado de tal forma que apenas rebasara el nivel de los pozos. Se colocaron cuidadosamente las muestras en los carriles respectivos. se conectaron los electrodos a la fuente de poder y finalmente se encendió el aparato para que el ADN comenzara a correr.

Reactivos para la obtención de los fragmentos de ADN.

Solución A.

- Tris 10 mM pH= 7.5 10 μ l
- EDTA 1 mM 20 μ l
- Tritón 20 μ l
- Aforar en 10 ml de agua destilada.

Solución B.

- SDS al 1 % 800 μ l.
- EDTA 1 mM 20 μ l.
- Aforar en 10 ml de agua destilada.

- RNasa 50 μ g/ml.
- Proteinasa K 500 μ g/ml.
- Etanol absoluto.
- Solución de NaCl 2.5 M pH=5.2.
- Marcador preparado 2 μ l.
- Tris-edta (TE) 8 μ l

Morfología de células HeLa.

Instrumental.

- Autoclave.
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Guantes y gasa estériles.
- Papel aluminio.
- Cinta adhesiva.
- Cajas de petri
- Tubos Ependor.
- Incubadora.
- Microscopio optico invertido.
- Campana de flujo laminar.
- Glicerina.
- Cajas de cultivo de 75 ml
- Pipetas serológicas de 10 y 5 ml.
- Micropipetas y puntas aplicadoras.

Reactivos.

- Etanol absoluto.
- Cisplatino 40 μ M.
- Medio de Cultivo DMEM.
- PBS 1x.
- Bromuro de etidio 10 μ g/ml.
- RNasa (1.5 μ l de RNasa + 1.5 ml de PBS).
- Sol. de HCl 5 N.
- Agua destilada
- Etanol 70 %